**改訂 2015 年 9 月 10 日（第 7 版）
体外診断用医薬品　　*改訂 2015 年 1 月 21 日（第 6 版）
承認番号22200AMX00913000　　日本標準商品分類番号87749

ご使用に際しては本添付文書をよく読んでからご使用ください。

マイコバクテリウム核酸キット

ジーンキューブ ® MAC

［全般的な注意］

ア．　本品は全自動遺伝子解析装置GENECUBE®の専用試薬です。
イ．　本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
ウ．　診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて医師が総合的に判断してください。
エ．　添付文書以外の使用目的及び使用方法でご使用されて得られた測定結果については保証を致しかねます。
オ．　本品を使用する前には必ず安全データシート（SDS）を確認してください。またSDSは末尾記載の問い合わせ先までご請求ください。*
カ．　使用する専用機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

［形状・構造等（キットの構成）］

1．酵素試薬［ KOD Mix ］
　KOD DNA ポリメラーゼ
　dNTP※
2．プライマー・プローブ試薬［ MAC Mix ］
　MAC プライマー F
　MAC プライマー R
　MAC QProbe
　硫酸マグネシウム
3．内部コントロール試薬［ IC Mix ］
4．陽性コントロール溶液［ MAC PC ］
5．陰性コントロール溶液［ MAC NC ］

※ 「dNTP」はデオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸の混合物です。

［使用目的］

喀痰中のマイコバクテリウムアビウムコンプレックスDNAの検出（非結核性抗酸菌症診断の補助）

［測定原理］

本試薬は、「Polymerase Chain Reaction（PCR）法による標的核酸増幅」と「蛍光標識プローブ（QProbe※）を用いた標的核酸検出」を利用した抗酸菌の *Mycobacterium avium* complex（MAC：*Mycobacterium avium*、*Mycobacterium intracellulare*）DNA 検出試薬です。
MAC の DnaJ 遺伝子領域をターゲットに MAC プライマーF と MAC プライマーR をアニーリングさせます。KOD DNA ポリメラーゼによって各プライマーの伸長が起こります。この時 dNTP を基質、マグネシウムイオンを酵素の活性触媒として用います。プライマーのアニーリング、伸長を繰り返し行うことで標的核酸を増幅させます。その後、増幅核酸と MAC に特異的な配列を持つ MAC QProbe をハイブリダイゼーションさせて蛍光の変化を解析することで MAC の DNA 検出を行います。
増幅に「高速増幅可能な KOD DNA ポリメラーゼ」、検出に「シンプルな設計の QProbe」を利用して簡便迅速な検出を可能にします。また、容器を開封せずに増幅検出を行うホモジニアス系のためキャリーオーバーコンタミネーションを防止し、偽陽性の発生を抑えることができます。
さらに、内部コントロールを反応系に組み込むことで臨床検体由来の妨害物質による PCR 阻害を知ることができ、MAC DNA 検出における偽陰性を防ぐことができます。

※ 「QProbe」は日鉄住金環境株式会社が特許実施権を有する消光プローブです。*

［操作上の注意］

1．検体について
（1）本品の試料には、喀痰から抽出したDNA溶液を用います。
（2）血液成分が多量に含まれている検体は避けてください。血液成分が多量に含まれている検体またはヘパリンを多く含む検体を用いる場合は、試料調製の段階で十分に血液成分またはヘパリンを取り除いておくよう注意してください。試料中に血液成分やヘパリンが残存していると増幅検出反応が阻害されて検出できないことがあります。
（3）咽頭粘液や唾液あるいは鼻水ではなく膿性部分が存在する良質な喀痰を採取するようにしてください。
（4）検体を保存する場合は、－80℃以下で保存してください。冷凍保存された検体を使用するときは、必ず室温に戻してから使用してください。

2．試料の調製方法
（1）検体の前処理法
本品の測定で使用する検体の前処理方法には、タンパク質分解酵素であるセミアルカリプロテアーゼ（SAP）※1での検体均質化処理を行った後、NALC-NaOH 法で処理して消化及び汚染除去を行ってください。NALC-NaOH 法は、一般的に抗酸菌検査である塗抹検査や培養検査の検体前処理法としても用いられています。他の方法で前処理された試料では本試薬の性能を得られないことがありますのでご注意ください。

①臨床検体※2を等量～5倍量のSAPで均質化します。
②底が円錐形の滅菌プロピレンスクリューキャップ付50mL遠心管に1mL～15mLの均質化検体を移し、倍量の NALC-NaOH 溶液※3を加えます。
③キャップを固く締め、Vortex で撹拌（20秒以内）後、容器を転倒してスクリューキャップチューブの内面を NALC-NaOH 溶液に曝します。
④20～25℃で15分間静置し、その間時々軽く手振りします。
⑤50mL目盛りのところまで冷滅菌リン酸緩衝液（pH6．8）を加え、キャップを固く締めます。
⑥エアロゾルフリーの封じ込め遠心カップ付冷却遠心機で3000×g、4℃、20分間遠心します。
⑦消毒剤を入れた容器に上清を静かに捨て、遠心管の口をアルコール綿で拭きます。
⑧残渣を1mLの滅菌リン酸緩衝液（pH6．8）、または滅菌蒸留水に浮遊させます。
⑨前処理済み検体を核酸抽出処理に使用します。すぐに使用しない場合は－20℃以下で保存します。

※1　スプタザイム（極東製薬）、プレソルブ（ニッスイ）の製品名で市販されています。各製品の指示書に従って操作してください。
※2　喀痰が対象となります。
※3　NALC-NaOH 溶液の組成を示します。

4％水酸化ナトリウム	50mL
0.1mol/L（2．9％）クエン酸ナトリウム	50mL

両者を混和、121℃、15分高圧滅菌して保存します。その後、使用する前に NALC 粉末0．5gを加えて24時間以内に使用します。

（2）核酸抽出方法
核酸抽出にあたっては、各核酸抽出キットの使用方法に従って行います。
以下に全自動遺伝子解析装置GENECUBE®と用手法であるISOPLANT（ニッポンジーン）を用いた核酸抽出方法を示します。注意事項など詳細については製品の指示書に従って操作してください。
＜全自動遺伝子解析装置GENECUBE®＞
①前処理済み検体300μLを1．5mL スクリューキャップ付ポリプロピレンチューブに移します。
②溶解吸着液300μLと混和、80℃10分間加熱し1,000×g、3分間の遠心分離を行います。
③上清を試薬カートリッジに移してアルミシールを貼付します。
④試薬カートリッジをGENECUBE®にセットします。
⑤GENECUBE®の取扱説明書に従って操作してください。
＜用手法＞（ISOPLANT を用いた方法）
①滅菌プロピレンスクリューキャップ付1．5mL遠心チューブに、前処理済み検体 100μLを移します。
②Solution Ⅰ　300μLを加えてキャップを固く締め、Vortex で撹拌（1～2秒間）を行います。
③冷却遠心機を用いてスピンダウンを行い、キャップ付近の溶液を落とします。
④SolutionⅡ　150μLを加えてキャップを固く締め、Vortex で撹拌（5～6秒間）を行います。このとき白濁が起こったことを確認してください。
⑤50℃で15分間静置し、時々転倒混和します。
⑥冷却遠心機を用いてスピンダウンを行い、キャップ付近の溶液を落とします。
⑦SolutionⅢ　150μLを加えてキャップを固く締め、Vortex で撹拌（1～2秒間）を行います。
⑧氷上で15分間静置し、時々転倒混和します。
⑨冷却遠心機で13000×g、4℃、15分間の遠心分離を行います。
⑩水相400μLを別の滅菌プロピレンスクリューキャップ付1．5mL遠心チューブに移し、1mLの99．5％エタノールを加えて混合します。
⑪冷却遠心機で13000×g、4℃、10分間の遠心分離を行います。
⑫上清を除去し、70％エタノールで洗浄後、乾燥します。
⑬10mmol／L　Tris-HCl（pH7．5）20μLにて沈殿を溶解し、試料（検体調製液）とします。

3．交差反応
MAC2 種（*M.avium, M.intracellulare*）から抽出した DNA 試料について測定を行ったところ、検出が確認されました。MAC 以外の抗酸菌 39 種から抽出した DNA 試料について測定を行ったところ、交差反応は認められませんでした。

4．共存物質の影響
ヒトゲノム混入における影響は、10 万コピー／テストのヒトゲノムが混入しても本試薬の測定に影響しないことを確認しました。

5．コンタミネーションの防止
本品は、試薬の分注から増幅専用容器への試薬の充填、増幅検出までを専用機器にて自動で行います。増幅検出を一つの容器で、開封することなしに行え、かつ測定を終了した試薬はそのまま自動で廃棄するため、キャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を抑えることができます。しかし、専用機器では検体の調製段階で発生するクロスコンタミネーションは防止することができませんので、注意する必要があります。特に検体およびコントロールの前処理中に発生することが考えられますので、以下の操作法を遵守するようにしてください。
（1）作業区域の分割
検体の調製は必ず安全キャビネットを利用してください。
（2）手袋、マスク、白衣の着用
人体に付着した微生物や体液（例えば唾液、汗）の混入を防ぐため、また検体からの感染防止の観点からも手袋、マスク、白衣を着用して操作を行ってください。専用機器への試薬のセット時には、検体の調製時に使用した手袋は使用せず、新しい手袋を使用してください。
（3）検体液の付着の防止
遠心チューブや検体保存容器の蓋に付着した検体液は、蓋を開けるときに手袋へ付着する可能性が高いため、軽く遠心分離を行うなどして蓋に付着していない状態で開閉してください。複数の検体を同時に取扱う時は、各容器の蓋を開放したまま次の操作を行わず、必ず蓋を閉めてから次の操作へ移ってください。
（4）フィルター付ピペットチップの使用
検体の調製時に使用するピペットがエアーディスプレースピペットの場合、サンプルとピストンの間に空気が介在するため、ピペット内部を汚染してしまう可能性があります。ピペット内部の汚染を防止するため、フィルター付のチップを利用してください。

以上の操作法を遵守しても、コンタミネーションが起こる可能性がありますので結果の判定につきましては臨床症状や培養など他の検査結果も含めて総合的に判断してください。

6．その他留意事項
（1）本試薬は全自動遺伝子解析装置GENECUBE®の専用試薬です。
（2）検体調製液中にPCRの妨害物質であるヘパリンやEDTAが含まれていると正常な測定ができませんのでご注意ください。
（3）検体中に標的となるDNAが存在しても検体前処理操作で最小検出感度以下になった場合は陰性と判定されますのでご注意ください。
（4）酵素試薬［ KOD Mix ］及び内部コントロール試薬［ IC Mix ］はジーンキューブ®MTB及びジーンキューブ®MACとの間で共通試薬として使用できます。

［用法・用量（操作方法）］

1．試薬・試液調製法
・酵素試薬［ KOD Mix ］：そのまま用います。
・プライマー・プローブ試薬［ MAC Mix ］：そのまま用います。
・内部コントロール試薬［ IC Mix ］：そのまま用います。
・陽性コントロール溶液［ MAC PC ］：そのまま陽性コントロールとして用います。
・陰性コントロール溶液［ MAC NC ］：そのまま陰性コントロールとして用います。

2．必要な器具、器材、試料など
・全自動遺伝子解析装置GENECUBE® 及びその付属品、取扱説明書
・ジーンキューブ®専用プラスチックキャピラリー
・ジーンキューブ®専用分注チップ
・マイクロピペット及びチップ（検体調製液分注用）
・ゴム手袋
・マスク
・8連チューブ（試薬分注用）
・サンプルチューブ（0．5mL）（検体調製液、陽性コントロール、陰性コントロール分注用）
・ジーンキューブ®専用モノリスチップ
・ジーンキューブ®専用試薬リザーバー
・ジーンキューブ®専用試薬カートリッジ
・ジーンキューブ®専用前処理セット
・シリンジ 2.5mL SS-02SZ テルモ

3．操作方法
本品は、専用機器GENECUBE®を用いて測定してください。
GENECUBE®の操作方法は、機器の取扱説明書に従ってください。
（3）～（8）はGENECUBE® で自動的に行われます。
（1）各試薬、各消耗品を機器の所定の位置にセットします。
（2）陽性コントロール溶液［ MAC PC ］、陰性コントロール溶液［ MAC NC ］および検体調製液を分注した0．5mLチューブを機器の所定の位置にセットします。
（3）検体調製液3μLに、内部コントロール試薬［ IC Mix ］1μL、酵素試薬［ KOD Mix ］3μL、プライマー・プローブ試薬［ MAC Mix ］3μLを加えて混合し、反応液を調製します。
（4）反応液を専用チップで専用プラスチックキャピラリーに充填します。
（5）専用機器GENECUBE®の増幅反応パラメーター※1 で、増幅反応を行います。
（6）専用機器GENECUBE®の検出反応パラメーター※2 で、検出反応を行います。その後、測定波長510nm～550nm及び573nm～613nmでの蛍光値を測定します。
（7）陽性コントロール溶液［ MAC PC ］及び陰性コントロールコントロール溶液［ MAC NC ］について検体調製液と同様に（3）～（6）の操作を行います。
（8）測定した蛍光値は専用の解析ソフトにより、蛍光変化量を表す蛍光微分値に変換されます。蛍光微分値を用いて結果の解析が行われ、測定画面上に判定結果が表示されます。

※1　増幅反応パラメーター

	35.0	℃	0.0	sec
	94.0	℃	30.0	sec
①変性	98.0	℃	1.0	sec
②アニーリング	60.0	℃	3.0	sec
③伸長	63.0	℃	5.0	sec
	35.0	℃	0.0	sec
①～③サイクル回数	50.0			

※2　検出反応パラメーター

94.0　℃	30.0	sec
39.0　℃	30.0	sec
40.0～75.0℃	0.09	℃/sec

[測定結果の判定方法]

1. 判定方法

GENECUBE®では検体、陽性コントロールおよび陰性コントロールの測定結果を自動的に判定し、測定画面上に表示されます。
検体の判定結果は、陽性「＋」、陰性「－」、判定無効「Invalid」で表示されます。

(1)判定無効の場合

「Invalid」と表示された場合、その試験は無効となります。検体の調製から行い、再度測定を実施してください。

(2)以下の場合は、その回の測定は無効になります。全ての試薬を入れかえ又は装置の取扱説明書に従い、汚染洗浄を行った後、再度測定を実施してください。

・陽性コントロール溶液[MAC PC]の測定結果が、陰性を示した場合。
・陰性コントロール溶液[MAC NC]の測定結果が、陽性を示した場合。

2. 判定上の注意

(1)以下の場合、正常に測定できないことがありますのでご注意ください。

a)唾液成分が多い、血液が混入している、室温で長時間放置した、など良質な喀痰ではない検体を使用した場合
b)塗抹検査陰性もしくは100μL中100個以下の菌体数しかない検体を使用した場合
c)検体調製が不十分で、菌体のロスまたはDNAの分解が生じている検体を使用した場合
d)ヘパリンを多く含む検体を使用した場合
e)保存方法が適切に行われていないもしくは有効期限を過ぎている試薬を使用した場合
f)NALC-NaOH 処理済検体の保存が適切に行われていない検体を使用した場合

(2)臨床検体中に含まれる MAC が死菌である場合、放出された MAC DNAを検出する可能性があります。

(3)本品で陰性と判定されても必ず MAC が存在しないというわけではありません。測定結果に基づく診断は、他の検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。

[性能]

1. 性能

用法・用量(操作方法)欄の操作法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行なった場合、下記の規格に適合します。

(1)感度試験

①陰性コントロールを所定の操作で測定するとき、陰性を示します。
②陽性コントロール(MAC DnaJ 遺伝子配列の一部を含むプラスミドDNA)を所定の操作で測定するとき、陽性を示します。

(2)正確性試験

①自家管理陰性試料1～3を測定するとき、陰性を示します。
②自家管理陽性試料1～3を測定するとき、陽性を示します。

(3)同時再現性試験

①自家管理陰性試料1を4回同時に測定するとき、すべて陰性を示します。
②自家管理陽性試料1を4回同時に測定するとき、すべて陽性を示します。

(4)最小検出感度

15コピー／テスト (専用機器GENECUBE®測定)

(5)較正用基準物質

本品の較正用基準物質には MAC DnaJ 遺伝子配列の一部を含むDNA溶液を使用しています。

2. 相関性

本品と既承認品であるコバスアンプリコアマイコバクテリウムアビウム、イントラセルラーと培養同定法の相関性を検討しました。臨床検体138例(喀痰)を試料に測定を行ったところ、コバスアンプリコアマイコバクテリウムアビウム、イントラセルラーとの相関は表1に示すように一致率98.6%、培養同定法との相関は表2に示すように一致率92.8%でした。

表1 既承認品との相関性試験成績

		既承認品	
		陽性	陰性
本品	陽性	67	1※1
	陰性	1※2	69

※1 培養同定検査の結果は、結核菌群陽性と判定されました。
※2 培養同定検査の結果は、陽性と判定されました。

検討例数 138例
全体一致率 98.6% (136／138)

表2. 培養同定法との相関性試験成績

		培養法	
		陽性	陰性
本品	陽性	65	3※3
	陰性	7※4	63

※3 2検体で塗抹検査の結果陽性、PCR 検査の結果陽性と判定されました。
1検体で塗抹検査の結果陰性、培養検査の結果結核菌群陽性、PCR 検査の結果陰性と判定されました。
※4 3検体で塗抹検査の結果陰性、PCR 検査の結果陰性と判定されました。
3検体で塗抹検査の結果陽性、PCR 検査の結果陰性と判定されました。
1検体で塗抹検査の結果陽性、PCR 検査の結果陽性と判定されました。

検討例数 138例
全体一致率 92.8% (128／138)

[使用上又は取扱上の注意]

1. 取扱上の注意

(1)検体を取扱う時は、マスク(N95マスク推奨)、使い捨て手袋、実験着などの保護具を着用して、吸い込んだり体に付着したりすることがないようご注意ください。
(2)検体は感染性を有するものとして、各施設の安全管理規程に従って十分注意して取扱ってください。
(3)検体やその他の試薬を扱う時は口によるピペッティングを行なわないでください。
(4)試薬が誤って目や口に入った場合は、直ちに水で十分洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の診察・治療などを受けてください。
(5)試薬が誤って皮膚に付着した場合は、直ちに多量の水で洗い流してください。
(6)試薬が飛散した場合には拭き取った後、エタノールを湿らせたキムワイプなどで拭き取ってください。
(7)検体を含む溶液が飛散した場合は手袋とマスク着用の上、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度0.5%)などの消毒液を使用してしっかりと拭き取ってください。
(8)検体を取扱う際に使用した器具類は、使い捨てのものであれば適切な処理の後廃棄、繰り返し使用するものであれば高圧蒸気滅菌器を用いて121℃、20分間以上滅菌処理を行うか、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度0.5%)などに1時間以上浸すなどにより十分に消毒してからご使用ください。

2. 使用上の注意

(1)機器、試薬および消耗品は専用のものを使用し、それらは他の目的に転用しないでください。
(2)本品に含まれる試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、凍結させたり、長時間室温に放置したりしないでください。また、貯蔵方法以外の条件で保存した試薬や使用期限を過ぎている試薬は使用しないでください。
(3)ジーンキューブ® MTB及びジーンキューブ® MACとの間で共通試薬として使用できる酵素試薬[KOD Mix]と内部コントロール試薬[IC Mix]はロットが異なっていてもプライマー・プローブ試薬[MAC Mix]と組み合わせて使用できます。ただしすべての構成試薬は異なるロットの試薬を継ぎ足して使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

(1)使用済みの試薬及び器具などを廃棄する場合には医療用廃棄物に関する規定に従って廃棄してください。
(2)試薬を廃棄する場合は水質汚濁防止法などの規制に留意して処理してください。
(3)使用済みの試薬及び消耗品を廃棄する場合には、溶液を飛散させないように取り出してください。

[貯蔵方法・有効期間]

貯蔵方法 2～8℃で保存
有効期間 1年 (期限は外箱に表示)

[包装単位]**

商品名	構成試薬名、包装内容
ジーンキューブ®MAC	酵素試薬[KOD Mix] 140μL×6 本
	プライマー・プローブ試薬[MAC Mix] 140μL×6 本
	内部コントロール試薬[IC Mix] 300μL×1 本
	陽性コントロール溶液[MAC PC] 300μL×1 本
	陰性コントロール溶液[MAC NC] 300μL×1 本

[主要文献]**

1) Yamada-Noda M. *et al. Mycobacterium* species identification - A new approach via *dnaJ* gene sequencing. Syst Appl Microbiol. 2007 Sep; 30(6): 453-462.
2) Kitabayashi M. *et al.* Gene Cloning and Polymerase Chain Reaction with Proliferating Cell Nuclear Antigen from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. Biosci Biotechnol Biochem. 2002 Oct; 66(10): 2194-2200.
3) Kurata S. *et al.* Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer.Nucleic Acids Res. 2001 Mar 15; 29(6): e34.
4) Torimura M. *et al.* Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base. Anal Sci. 2001 Jan; 17(1): 155-160.
5) 樋口 武史ほか 結核菌検査指針 2007 財団法人結核予防会 2007: 31-36

文献請求先 末尾記載の問い合わせ先までご請求ください。

TOYOBO
Ideas & Chemistry

[問い合わせ先]

東洋紡株式会社 診断システム事業部
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目２番８号
TEL 06-6348-3335 FAX 06-6348-3833

協和メデックス株式会社 学術担当
〒104-6004 東京都中央区晴海一丁目8番10号
ダイヤルイン 03-6219-7608

[製造販売元]

東洋紡株式会社
福井県敦賀市東洋町10番24号